

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 9 月 18 日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/076652 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/48 (74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02897
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 12 日 (12.03.2003) (81) 指定国 (国内): JP, KR, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-66814 2002 年 3 月 12 日 (12.03.2002) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ヤトロン (IATRON LABORATORIES, INC.) [JP/JP]; 〒101-0031 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 Tokyo (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 藤井 隆行 (FUJII, Takayuki) [JP/JP]; 〒101-0031 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内 Tokyo (JP).

(54) Title: REAGENT FOR MEASURING ALANINE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬

(57) Abstract: It is intended to disclose a reagent for measuring alanine aminotransferase activity which contains L-alanine, 2-oxoglutaric acid, lactate dehydrogenase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide, characterized by further containing a substance having an effect of inhibiting lactic acid dehydrogenase activity. It is also intended to disclose a method of measuring alanine aminotransferase activity characterized by comprising bringing a sample likely containing alanine aminotransferase into contact with L-alanine, 2-oxoglutaric acid, lactate dehydrogenase, reduced nicotinamide adenine dinucleotide and a substance having an effect of inhibiting lactic acid dehydrogenase activity. According to the above reagent or the above measurement method, an increase in the reagent blank (i.e., an increase in the initial absorbance) can be suppressed.

(57) 要約: L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含むアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬において、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を、更に含むことを特徴とする、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬を開示する。また、アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させることを特徴とする、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法を開示する。前記測定試薬又は測定方法によれば、試薬ブランク反応の上昇、すなわち、初期吸光度の上昇を抑制することができる。

WO 03/076652 A1

明 細 書

アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬

技術分野

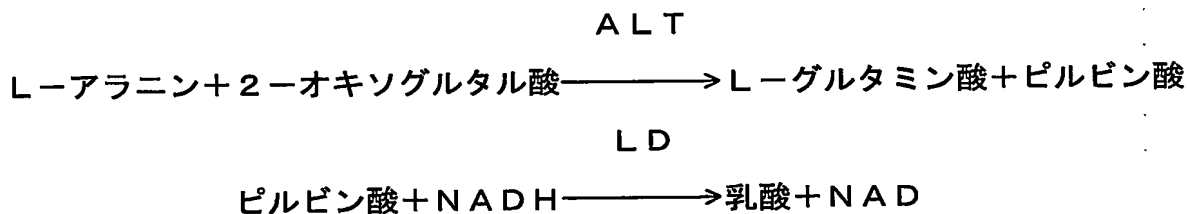
本発明は、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬に関する。

背景技術

アラニンアミノトランスフェラーゼ（以下、A L Tと略称する）は、心臓や肝に多く分布する酵素であり、各種疾患時に血中に遊出されるので、尿や血液等の生体液中A L T活性の測定は、心疾患又は肝疾患の診断や治療の経過観察の指標として重要な項目の一つである。

A L T活性の測定法としては、L-アラニン及び2-オキソグルタル酸を基質として、A L Tによって生成されるピルビン酸を乳酸脱水素酵素（以下、L Dと略称する）によって乳酸に変え、共存させておいた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下、N A D Hと略称する）量の減少量を、波長340nm付近で測定することによりA L T活性を測定する方法が汎用されている。

この反応式を示せば、以下のとおりである。



なお、前記式中で、N A Dは酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドである。

先に述べたとおり、A L T活性測定は、心疾患又は肝疾患の診断や治療の経過観察の指標として重要な項目の一つであるため、国際的に測定されている。しかし、A L T活性の測定法は各種知られており、いろいろな測定法が用いられているため、施設間や測定者間で測定値が異なり、その測定値の互換性がとりずらく、

臨床的な診断に支障をきたす恐れがある。そのため、各国において、反応原理、試薬組成、及び試薬濃度等を規定した勧告法が提唱されており、勧告法で求められた測定値と互換性が得られるよう、各施設においてALT活性測定が行われるようになってきた。

日本でも日本臨床化学会（JSCC）が1989年にALT活性測定の勧告法を公表している〔日本臨床化学会：ヒト血清中酵素活性測定の勧告法—アラニンアミノトランスフェラーゼ（1989-08-30），臨床化学，18（4），250-262（1989）〕。

日本臨床化学会の公表した前記勧告法は、測定値の互換性を取るために、臨床検査室等の技術レベルで共有することのできる共通の酵素活性測定を最適な条件で測定する方法であるため、一般には日常の検査法として使用することのできるものではない。そこで、臨床検査薬メーカーは、日本臨床化学会の勧告法と測定値との互換性が取れるような試薬を提供している。そして、日本臨床化学会の勧告法と測定値との互換性が取れることを前提に、正確で、精密な測定値を得られるような、より安定で、安価な試薬を提供しようと日々努力している。

このように、臨床検査室等のALT活性測定を行なっている施設では、日常の検査法として日本臨床化学会の勧告法と測定値との互換性が取れるような臨床検査薬メーカーの提供するALT活性測定試薬を使用しているのが一般的である。しかしながら、生体試料は多種類の成分の混合物であり、また、ALT活性測定試薬も多種類の成分の混合物であることから、試薬の安定化や夾雑物の影響を受けないようなALT活性測定試薬の開発は極めて困難である。

特に、測定試薬をセットし、条件を設定するだけで自動的に測定する自動分析機と呼ばれている分析装置では、数週間に渡り蓋を開けたまま放置して測定することが多く、この場合、大気中の二酸化炭素を吸収し、ALT活性測定試薬のpHが変化し、試薬ブランク反応も変わり、得られるALT活性測定値に誤差が発生する問題点があった。

従って、本発明の課題は、試薬ブランク反応の上昇、すなわち、初期吸光度の上昇を抑制することのできるALT活性測定試薬を提供することにある。

発明の開示

前記課題は、本発明による、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含むアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬において、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を、更に含むことを特徴とする、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬により解決することができる。

本発明の好ましい態様においては、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬は、2試薬からなり、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方、あるいは、両方に、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を含有する。

本発明の更に好ましい態様においては、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬は、2試薬からなり、同一試薬中に、乳酸脱水素酵素と乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを含有する。

本発明の別の好ましい態様においては、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬は、少なくとも乳酸脱水素酵素を第一試薬として、少なくとも2-オキソグルタル酸を第二試薬として含有する2試薬系である。

本発明の測定試薬の更に別の好ましい態様においては、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質が、オキサミン酸又はその塩である。

また、本発明は、アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させることを特徴とする、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法に関する。

また、本発明は、アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させ、前記還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの減少量又は生成する酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの増加量を測定することを特徴とする、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法に関する。

本発明の測定方法の好ましい態様においては、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質が、オキサミン酸又はその塩である。

本発明の測定方法の別の好ましい態様においては、オキサミン酸又はその塩の濃度が、測定系における終濃度として、 $0.005 \sim 5 \text{ mmol/L}$ である。

本発明の測定方法の更に別の好ましい態様においては、乳酸脱水素酵素の濃度が、測定系における終濃度として、 100 U/L 以上である。

図面の簡単な説明

図1は、本発明及び比較用のALT活性測定試薬における、ブランク感度の経時的变化を示すグラフである。

図2は、本発明及び比較用のALT活性測定試薬を用いて測定した、プール血清中ALT活性測定値の経時的变化を示すグラフである。

図3は、本発明及び比較用のALT活性測定試薬における、LD安定性を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のALT活性測定試薬は、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、LD、及びNADHを含む公知のALT活性測定試薬の改良試薬である。L-アラニン、2-オキソグルタル酸、LD、及びNADHを含むALT活性測定試薬では、L-アラニン及び2-オキソグルタル酸を基質として、ALTによって生成されるピルビン酸をLDによって乳酸に変え、共存させておいたNADH量の減少量を、あるいは、生成するNADの増加量を、波長 340 nm 付近で測定することにより、ALT活性を測定することができる。

本発明のALT活性測定試薬は、これらの公知の構成成分に加え、LD活性に対する阻害作用を有する物質（以下、LD阻害剤と称する）を含む。本発明で用いるLD阻害剤としては、特に限定されるものではないが、例えば、オキサミン酸、シュウ酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、乳酸、若しくはヒドロキシグルタル酸、又はそれらの塩を用いることができ、ALT活性測定に誤差を与えることがない点で、オキサミン酸

又はその塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はリチウム塩）が好ましい。

本発明のALT活性測定試薬に含有されるLD阻害剤の濃度は、使用するLD阻害剤の種類により変化するもので、ALT活性測定試薬に影響を与えないLD活性が存在する濃度である限り、特に限定されるものではないが、一般的には、測定系における終濃度が0.001～100mmol/Lとなるように、測定試薬中の含有濃度を調整して用いることができる。

「ALT活性測定試薬に影響を与えないLD活性が存在する」とは、被検試料中のALT活性を測定するために最低必要なLD活性が少なくとも残存していることを意味し、LD阻害剤によりLD活性が阻害されても最低必要量のLD活性が残存していれば、ALT活性測定試薬としては問題にはならない。更に、本発明の目的は試薬ブランク反応を抑制することにあるので、ALT活性測定試薬に影響を与えないLD活性を有し、しかも、試薬ブランク反応がなるべく小さくなるような、LD添加量及びLD阻害剤量の組み合わせを適宜設定すればよい。

より具体的には、例えば、LD阻害剤としてオキサミン酸を用いる場合には、測定系における終濃度が、好ましくは0.005～5mmol/L、より好ましくは0.02～1mmol/Lとなる量で添加することにより、期待される効果を得ることができる。後述するように、試薬構成を第一試薬と第二試薬とに分ける場合においても、終濃度が前記と同様であれば、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方に、あるいは、両方に添加しても同様の効果を得ることができる。また、LD阻害剤をLDと共存させることにより、LDを安定化させる効果も併せて得ることができる。

本発明のALT活性測定試薬に含有される構成成分の内、公知のALT活性測定試薬に含まれる各種成分、すなわち、LD、NADH、L-アラニン、及び2-オキソグルタル酸については、公知のALT活性測定試薬と同様に用いることができる。

例えば、LDとしては、例えば、ニワトリ心臓由来、ブタ心臓由来、ブタ筋肉由来、若しくはロイコノストック・メセンテロイデス（*Leuconostoc mesenteroides*）由来の天然型LD、又はそれらの組換え型LDを用いることができ、その由来は特には限定されない。

また、本発明のALT活性測定試薬に含有されるLDの濃度は、測定系における終濃度が、少なくとも100U/L以上となるように、適宜選択して用いることができる。なお、本発明のALT活性測定試薬はLD阻害剤を更に含むことを特徴としているので、LD阻害剤によるLD阻害分を考慮し、終濃度活性が少なくとも100U/L以上となるように、適宜選択して用いることができる。例えば、LD阻害剤としてオキサミン酸を0.02~1mmol/Lとなる量で添加する場合においても、終濃度活性が少なくとも100U/L以上となるように、適宜選択して用いることができる。

なお、本明細書において「LD活性」とは、ピルビン酸を乳酸に還元する活性を意味する。また、その単位「U」は、1分間に1μmolの基質（ピルビン酸）を生成物（乳酸）に転換する酵素活性の量（標準温度は30℃）で定義される。

本発明のALT活性測定試薬に含有されるNADHの濃度は、測定系における終濃度が、好ましくは0.05~2mmol/L、より好ましくは0.1~0.5mmol/Lとなる範囲で使用する事ができる。

基質であるL-アラニンの濃度は、測定系における終濃度が、好ましくは100~3000mmol/L、より好ましくは200~2000mmol/Lとなる範囲で使用する事ができる。

また、もう一つの基質である2-オキソグルタル酸の濃度は、測定系における終濃度が、好ましくは1~500mmol/L、より好ましくは5~100mmol/Lとなる範囲で使用する事ができる。

本発明のALT活性測定試薬は、公知のALT活性測定試薬と同様に、適当な緩衝剤を更に含むことができ、前記緩衝剤としては、ALT活性測定への悪影響がない限り、従来公知の緩衝液を適宜選択して使用することができる。具体的には、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、リン酸、2-[4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジル]エタンスルホン酸、ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン、2-ヒドロキシー-N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸、又はn-エ

チルモルフォリン等を使用することができる。

更に、本発明のALT活性測定試薬は、前記必須配合成分及び緩衝剤の他に、必要により、一般的に添加される成分、例えば、キレート剤〔例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等〕、防腐剤（例えば、アジ化物等）、安定化剤（例えば、アルブミン又はグリセロール等）、及び／又は各種界面活性剤等を適宜添加することができる。

本発明のALT活性測定試薬の試薬構成は、公知のALT活性測定試薬と同様に、特に限定されるものではなく、例えば、1試薬にまとめることもできるし、あるいは、2試薬以上の試薬構成とすることもできるが、一般的には、各構成成分が安定な条件に分け、活性測定に至適な条件にて反応することができる試薬構成にすることが好ましい。このような試薬構成としては、例えば、アルカリ性で安定なNADH及びLD等を含む第一試薬と、2-オキソグルタル酸等を含む第二試薬とに分け、反応時に活性測定に至適な試薬濃度及びpHになるようにこれらの各試薬を構成し、更に、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方、あるいは、両方に、LD阻害剤及びL-アラニンを添加することができるが、これに限定されるものではない。

また、被検試料として、ピルビン酸を含有する可能性のある被検試料（例えば、血液、血清、血漿、若しくは尿等の体液、又は細胞組織等）を測定する場合には、被検試料由来のピルビン酸の影響を排除するために、少なくともLDを第一試薬として含有し、2-オキソグルタル酸を第二試薬として含有する2試薬系とすることが好ましい。ピルビン酸を含有する可能性のある被検試料と、LDを含む第一試薬とを混合し、被検試料由来のピルビン酸を消去した後、第二試薬を添加することにより、被検試料由来のピルビン酸の影響を受けることなく、ALT活性を測定することができる。

なお、少なくともLD及び2-オキソグルタル酸を第二試薬として含有する2試薬系であっても、第二試薬添加後、例えば、数十秒から1分間程度で被検試料由来のピルビン酸を消去した後、ALT活性を測定することができるし、あるいは、1試薬系であっても同様の目的を果たすことができ、従って、本発明のALT活性測定試薬は、特定の試薬構成に限定されるものではない。

本発明のALT活性測定試薬は、例えば、本発明のALT活性測定方法に用いることができる。本発明のALT活性測定方法では、被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、LD、NADH、及びLD阻害剤とを接触させ、NADH量の減少量を、あるいは、生成するNADの増加量を、波長340nm付近で測定することにより、ALT活性を測定することができる。

前記被検試料は、ALT活性を含有する可能性のある被検試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、臨床診断に一般的に用いられる生体由来液、例えば、血液、血清、血漿、若しくは尿、又は細胞組織、あるいは実験サンプルなどを挙げることができる。

作用

本発明者は、本発明のALT活性測定試薬において、試薬ブランク反応が抑制される理由を、以下の作用によるものと考えている。なお、本発明は、以下の推論に限定されるものではない。

本発明のALT活性測定試薬に含まれるLDは、主たる酵素活性である乳酸に対する脱水素酵素活性に加え、2-オキソグルタル酸を還元する活性、すなわち、2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素（HGD）活性を有することが知られている〔臨床化学，18（4），250-262（1989）〕。この反応を示せば、以下のとおりである。

HGD



従来技術欄で先述したように、日本臨床化学会の公表した勧告法も含め、汎用されているALT活性測定は、基質として2-オキソグルタル酸を用いているため、LDが2-オキソグルタル酸に対する脱水素酵素活性（すなわち、HGD活性）を有すると、NADHを酸化し、試薬ブランクや試薬ブランク反応を大きくしてしまう。

また、2-オキソグルタル酸に対する脱水素酵素活性は、pH変化により酵素活性が変化してしまい、得られるALT活性測定値に誤差が発生する。例えば、

測定試薬をセットし、条件を設定するだけで自動的に測定する自動分析機と呼ばれている分析装置では、数週間に渡り蓋を開けたまま放置して測定することが多く、大気中の二酸化炭素を吸収し、A L T 活性測定試薬のp Hが変化し、試薬ブランク反応も変わり、得られるA L T 活性測定値に誤差が発生する。

更に、2-オキソグルタル酸に対する脱水素酵素活性の存在は、A L T 活性測定でピルビン酸に対するL Dの見かけのK_m上昇をきたし、活性測定値への負の誤差を与えることが問題となっている。ここで起きる試薬ブランク反応は、L D自体が示す2-オキソグルタル酸を還元する反応、すなわち、H G D活性であると考えられる。

本発明者が確認したところ、L D中にH G D活性が存在し、A L T 活性測定試薬に添加されているL D量に依存して試薬ブランクも変化する。また、H G D活性は、弱酸性から中性付近に至適p Hを持っている。例えば、L D量を増やせば、試薬ブランクも大きくなるほか、弱アルカリ性条件下でA L T 活性を測定する場合、試薬容器開封保存後の試薬p H低下により試薬ブランクが大きくなってしまい、正確なA L T 活性測定値を得ることができない。

試薬ブランクを小さくするには、L D量を少なくすることが考えられるが、L D量が少なすぎると、A L T 活性測定を測定するための必要なL D量が不足し、定量性が得られなくなってしまう。また、試薬容器開封保存後の試薬p H低下による試薬ブランク上昇は、A L T 活性測定時のp Hをアルカリ性に移動することにより、試薬ブランクを回避できるが、A L T 活性の至適p Hは弱アルカリ性であるので、適当な方法とは言えない。

従来、H G D活性の阻害剤は全く知られておらず、このような状況下、本発明者は、公知のA L T 活性測定試薬にL D阻害剤を添加することにより、L D自体が示すH G D活性を阻害し、その結果、定量性が損なわれることなく、試薬ブランクを小さくし、試薬容器開封保存後の試薬p H低下による試薬ブランク上昇の回避や、ピルビン酸に対するL Dの見かけのK_m上昇によるA L T 活性測定値への負の誤差を低減することができたものと考えている。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

調製実施例 1

本発明のALT活性測定試薬として、表1に示す組成からなる第一試薬と、表2に示す組成からなる第二試薬とからなる2試薬系試薬を調製した。

また、比較用の従来公知のALT活性測定試薬として、第一試薬中にオキサミン酸を含まないこと以外は、前記第一試薬と前記第二試薬と同じ組成からなる2試薬系試薬を調製した。

以下、比較用の前記2試薬系試薬を「試薬A」と称し、本発明の前記2試薬系試薬を「試薬B」と称する。調製した試薬A及び試薬Bは、以下の評価例で使用するまで、それぞれ、密封可能な容器に入れ、密封状態で保存した。

表 1

濃度	含有成分
20mmol/L	Tris-塩酸 (pH 9.20)
200mmol/L	L-アラニン
0.5mmol/L	オキサミン酸
0.095%	アジ化ナトリウム
0.25mmol/L	NADH
3KU/L	LD (組換型LD; オリエンタル酵母工業株式会社製)

表 2

濃度	含有成分
360mmol/L	Tris-塩酸 (pH 4.50)
1080mmol/L	L-アラニン
63mmol/L	2-オキシグルタル酸
0.01%	EDTA 2Na

評価例 1 : 本発明のALT活性測定試薬の評価

(1) 試薬ブランクの測定

前記調製実施例 1 で調製した比較用の試薬 A の第一試薬 60 mL 及び第二試薬 20 mL、並びに本発明の試薬 B の第一試薬 60 mL 及び第二試薬 20 mL を、それぞれ、自動分析装置（7170S；株式会社日立製作所製）用の試薬容器に充填し、これらの試薬容器を自動分析装置にセットし、5 週間放置した。評価中の自動分析装置は、試薬容器がセットされている部分には冷却装置が付いており、約 10℃ に保たれている。また、試薬容器の蓋は開けた状態のままにした。

放置直後、1 週間経過後、2 週間経過後、3 週間経過後、4 週間経過後、及び 5 週間経過後に、それぞれ、以下の手順に従って、試薬 A 及び試薬 B の試薬ブランクを測定した。

より具体的には、自動分析装置の反応セルに、検体として生理食塩水 7.5 μ L を加えたところに、第一試薬 150 μ L を加えて攪拌し、37℃ で 5 分間加温した後、第二試薬 50 μ L を加えて攪拌し、更に 37℃ で 5 分間加温した。第二試薬を添加してから約 1 分経過後から 5 分経過後まで（すなわち、4 分間）の波長 340 nm における吸光度変化量を測定し、1 分間当たりの吸光度変化量を算出し、ブランク感度とした。結果を図 1 に示す。

図 1 に示すように、蓋を開けた状態で放置しておく、比較用の試薬 A では、試薬ブランクが経時的に上昇していくのに対して、本発明の試薬 B では、試薬ブランクがほとんど変化しなかった。

（2）プール血清における ALT 活性の測定

前記評価例 1（1）と同様に、前記調製実施例 1 で調製した試薬 A 及び試薬 B を 5 週間放置した。放置直後、1 週間経過後、2 週間経過後、3 週間経過後、4 週間経過後、及び 5 週間経過後に、それぞれ、以下の手順に従って、検体（プール血清）中の ALT 活性を測定した。

すなわち、プール血清又は生理食塩水（試薬ブランク） 7.5 μ L に第一試薬 150 μ L を加えて攪拌し、37℃ で 5 分間加温した後、第二試薬 50 μ L を加えて攪拌し、更に 37℃ で 5 分間加温した。第二試薬を添加してから約 1 分経過後から 5 分経過後まで（すなわち、4 分間）の波長 340 nm における吸光度変化量を測定し、1 分間当たりの吸光度変化量を算出した。ALT 活性は、プール血清の代わりに、酵素キャリアプレート（国際試薬株式会社製）を用いて得られ

た測定結果に基づいて、換算した。

結果を図2に示す。図2に示すように、プール血清の測定値に関しても、蓋を開けた状態で放置しておく、比較用の試薬Aでは、ALT活性測定値が経時的に上昇していくのに対して、本発明の試薬Bでは、ALT活性測定値の変動がほとんど見られなかった。

評価例2：本発明のALT活性測定試薬におけるLDの安定性に関する評価

本評価例では、前記調製実施例1で調製した比較用の試薬Aの第一試薬60mL及び本発明の試薬Bの第一試薬60mLを、それぞれ、70mL容の蓋付きポリエチレン製瓶に密封し、25℃又は37℃にて3週間保管し、各第一試薬中に含まれるLD活性の残存率の経時変化を調べた。

具体的には、保存直後、並びに保管開始から1週間経過後、2週間経過後、及び3週間経過後に、それぞれ、各試薬を採取し、測定時に各試薬を0.1%ウシ血清アルブミン含有50mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.50)にて1/10濃度に希釈したものを検体とし、以下の手順に従って、自動分析装置(7170S；株式会社日立製作所製)を用いて実施した。

検体7.5μLに、LD活性測定試薬1[50mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.50)及び0.25mmol/L-NADH]150μLを加え、37℃で5分間加温した後、LD活性測定試薬2[50mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.50)及び12mmol/Lピルビン酸リチウム塩]30μLを加えて攪拌し、更に37℃で5分間加温した。LD活性測定試薬2を添加してから約1分経過後から2分経過後までの波長340nmにおける1分間当たりの吸光度変化量を測定した。保存初日の吸光度変化量を100%としてLD活性の残存率を算出した。

結果を図3に示す。図3において、各記号「1W」、「2W」、及び「3W」は、それぞれ、保管開始から1週間経過後、2週間経過後、及び3週間経過後の結果であることを意味する。

図3に示すように、37℃及び25℃のいずれの条件下においても、本発明の試薬Bの方が、比較用の試薬Aと比べて、LD活性の残存率が高かった。

産業上の利用可能性

本発明のA L T 活性測定試薬によれば、試薬ブランク反応の上昇、すなわち、初期吸光度の上昇を抑制することができるので、正確なA L T 活性測定値を得ることができる。また、L D の安定化効果を有する。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含むアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬において、
乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を、更に含むことを特徴とする、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。
2. 2試薬からなり、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方、あるいは、両方に、
乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を含有する、請求項1に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。
3. 同一試薬中に、乳酸脱水素酵素と乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを含有する、請求項2に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。
4. 少なくとも乳酸脱水素酵素を第一試薬として、少なくとも2-オキソグルタル酸を第二試薬として含有する2試薬系である、請求項1に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。
5. 乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質が、オキサミン酸又はその塩である、請求項1～4のいずれか一項に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。
6. アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させることを特徴とする、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法。
7. アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させ、前記還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの減少量又は生成する酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの増加量を測定する、請

求項6に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法。

8. 乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質が、オキサミン酸又はその塩である、請求項6又は7に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法。

9. オキサミン酸又はその塩の濃度が、測定系における終濃度として、 $0.005 \sim 5 \text{ mmol/L}$ である、請求項8に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法。

10. 乳酸脱水素酵素の濃度が、測定系における終濃度として、 100 U/L 以上である、請求項6又は7に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法。

1 / 2

FIG. 1

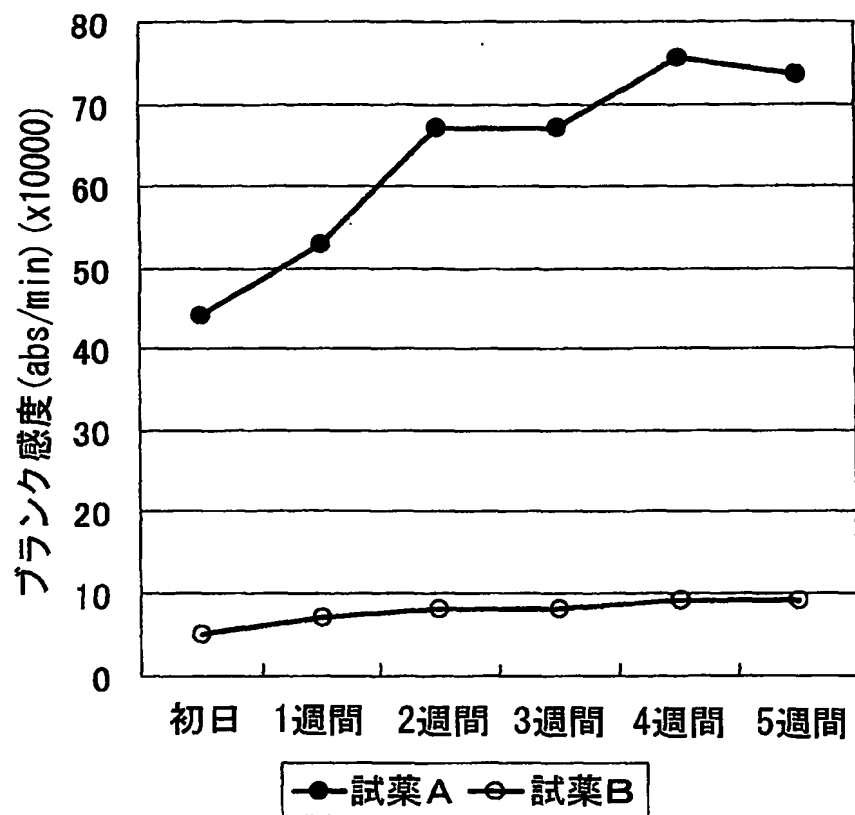
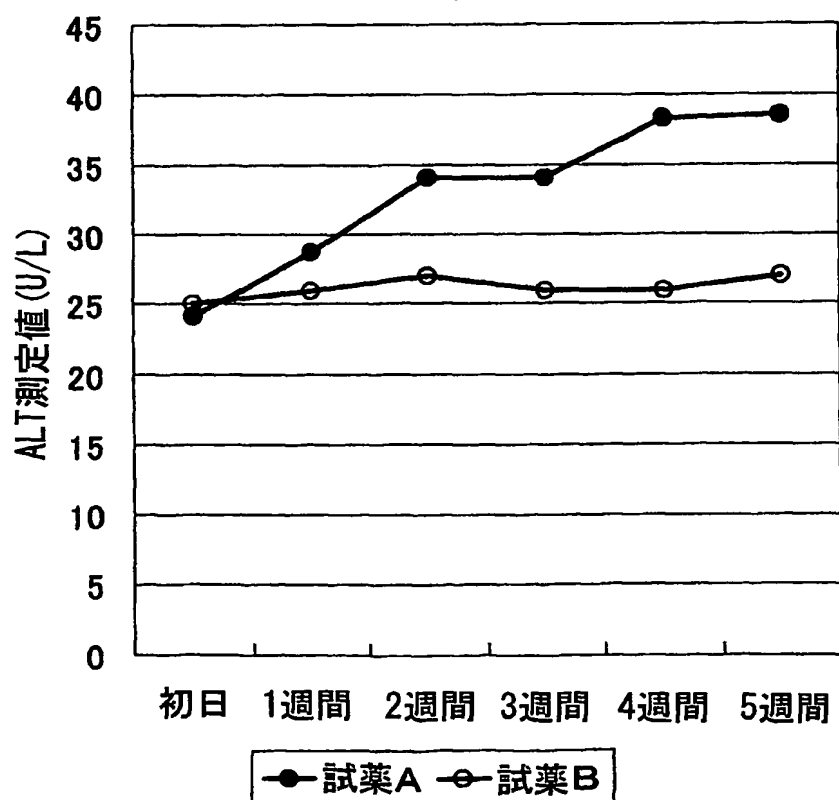
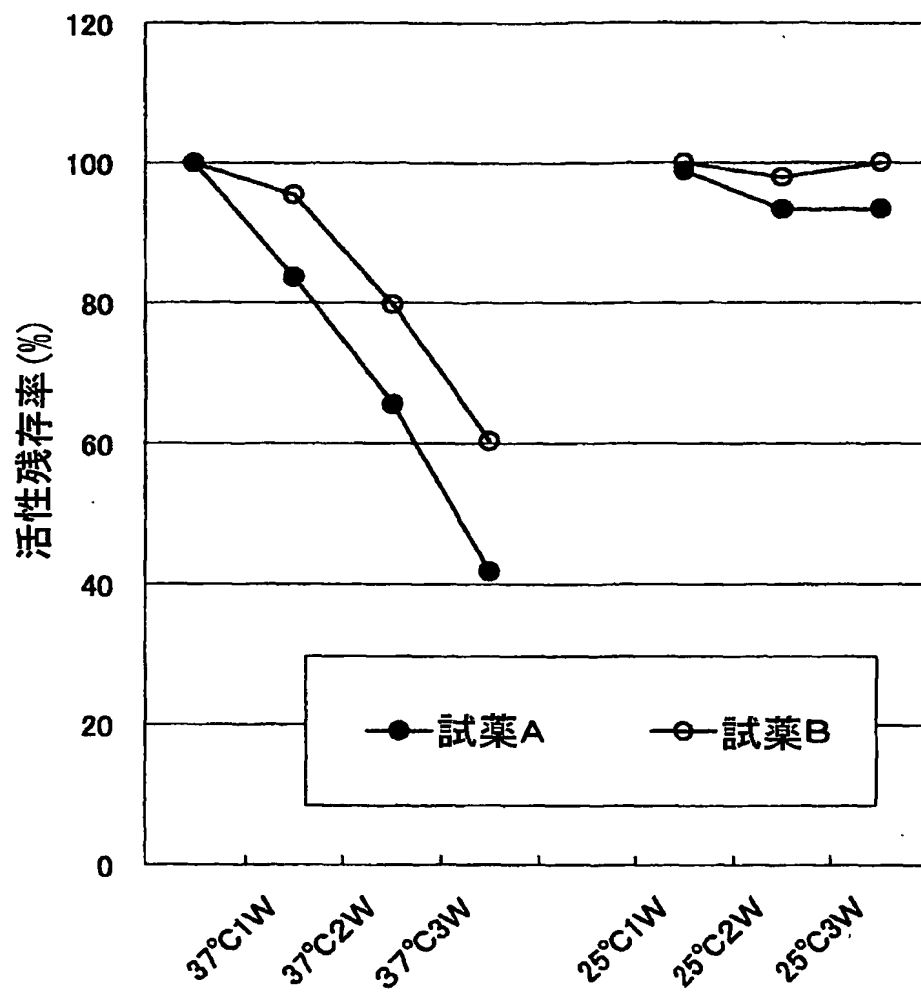


FIG. 2



2 / 2

FIG. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12Q1/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1083235 A (ORIENTAL YEAST CO., LTD.), 14 March, 2001 (14.03.01), Example 2 & JP 2001-061498 A	1-10
Y	US. 4241179 A (COULTER ELECTRONICS INC.), 22 December, 1980 (22.12.80), Claim 4 & JP 55-026899 A	1-10
A	JP 9-070299 A (A&T Corp.), 18 March, 1997 (18.03.97), (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 May, 2003 (20.05.03)

Date of mailing of the international search report
03 June, 2003 (03.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q 1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q 1/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 1083235 A (ORIENTAL YEAST CO LTD) 2001.03.14 & JP 2001-061498 A (実施例 2 参照)	1-10
Y	US 4241179 A (COULTER ELECTRONICS INC) 1980.12.22 & JP 55-026899 A (請求項 4 参照)	1-10
A	JP 9-070299 A (株式会社エイアンドティー) 1997.03.18 (ファミリーなし)	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.05.03

国際調査報告の発送日

03.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448